

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 08 MAR 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

102 60 265.4 ✓

Anmeldetag:

20. Dezember 2002 ✓

Anmelder/Inhaber:GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GmbH, 85764 Oberschleißheim/DE**Bezeichnung:**ELISA Verfahren zum Nachweis von Guanylate
Binding Protein-1 (GBP-1)**IPC:**

C 12 Q 1/25 ✓

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 2. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Geist

ELISA Verfahren zum Nachweis von Guanylate Binding Protein-1 (GBP-1)

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes.

10 Verschiedene Dokumente werden im Text dieser Beschreibung zitiert. Der Offenbarungsgehalt der zitierten Dokument (einschließlich aller Herstellerbeschreibungen, -angaben etc.) ist hiermit per Referenz Teil dieser Beschreibung.

15 Das Endothel ist ein Schlüsselorgan bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Zell-gesteuerter Immunantwort, Menstruation, Wundheilung, Entzündung, Allergie, Herz-Kreislaufferkrankung und Tumorwachstum. Die Pathofunktion des Endothels ist untrennbar mit der Aktivierung von Endothelzellen verbunden.

20 Die Aktivierung des Endothels ist ein komplexer Vorgang, der durch eine Vielzahl verschiedener löslicher Faktoren gesteuert wird, die im Blut zirkulieren oder von benachbarten Zellen freigesetzt werden (Fig. 1A). In Folge dieses Prozesses werden die Physiologie und Morphologie der Endothelzellen an die jeweiligen Erfordernisse im Gewebe angepasst. Im Vordergrund stehen hierbei die Steuerung
25 der Zellproliferation, Apoptose, Invasion, Migration und Leukozyten-Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen, wodurch die Neu- und Rückbildung von Gefäßen und die Extravasation von Leukozyten reguliert werden (Fig. 1A).

30 Die Vielzahl der beteiligten Faktoren legt nahe, dass mehrere Faktoren den selben Phänotyp steuern und zu wirkungsgleichen Gruppen zusammengefaßt werden können (Fig. 1B). Zum Beispiel aktivieren die angiogenen Wachstumsfaktoren *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF)

die Endothelzellproliferation, wohingegen die inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF)- α und Interferon (IFN)- γ die Proliferation hemmen und die Leukozyten-Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen erhöhen.

- 5 Derzeit gibt es keine geeigneten Methoden mit denen bestimmt werden kann, wo und wann die verschiedenen Faktoren in entzündlichen Geweben auf die Endothelzellen wirken. Daher ist über die räumliche und zeitliche Verteilung der verschiedenen Aktivierungszustände von Endothelzellen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen nur sehr wenig bekannt.

10

- Die Entwicklung von Entzündungsreaktionen und sich daraus ergebender entzündlicher Erkrankungen ist das einer sehr komplexen Abfolge (Kaskade) von unterschiedlichen und synergistischen Wirkungen von inflammatorischen Faktoren wie Zytokinen, die eine Analyse eines definierten Stadiums einer
- 15 Entzündungsreaktionen und/oder eine verlässliche Voraussage über deren weitere Entwicklung schwer möglich machen. Aufgrund dieser Komplexheit der ablaufenden Reaktionen spricht man in diesem Zusammenhang auch von sogenannten Zytokinnetzwerk.

- 20 Erste Arbeiten, einen molekularen Marker zu identifizieren, der eine Aktivierung von Endothelzellen durch die oben genannten inflammatorischen Zytokine im Gewebe anzeigt, führten zu vergleichenden Untersuchungen zur Genexpression in kultivierten Endothelzellen in Gegenwart unterschiedlicher Aktivierungsbedingungen. Mit diesem Ansatz konnte ein Gen isoliert werden, dessen Expression in
- 25 Endothelzellen selektiv durch inflammatorische Zytokine induziert wird (Fig. 2A) (Guenzi et al., 2001; Lubeseder-Martellato et al. 2002). Dieses Gen kodiert für das Guanylat-Bindungsprotein-1 (GBP-1), das zur Proteinfamilie der großen GTPasen gehört.

- 30 Um zu bestimmen, ob GBP-1 wie in kultivierten Zellen auch bei Gefäßendothelzellen in humanen Geweben eine Aktivierung durch inflammatorische Zytokine anzeigt, wurden immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von GBP-1 mittels spezifischer monoklonaler Antikörper durchgeführt. Dazu wurden

histologische Schnitte gesunder Haut und von Hauterkrankungen mit einer entzündlichen Komponente, wie zum Beispiel Psoriasis, Arzneimittelgegenreaktion und Kaposi-Sarkom untersucht (Fig. 2B). Allen genannten Hauterkrankungen ist gemeinsam, dass in den Läsionen fokal konzentriert zahlreiche Entzündungszellen vorliegen, die dieselben inflammatorischen Zytokine freisetzen, die auch zu einer erhöhten GBP-1-Expression führen. In den Gefäßen der gesunden Haut konnte GBP-1 in keinem Fall nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren in allen untersuchten entzündlichen Erkrankungen einzelne Gefäße deutlich positiv für GBP-1 (Fig. 2B, Pfeile). Diese Ergebnisse zeigten, dass GBP-1 tatsächlich auch in humanen Geweben eine inflammatorische Aktivierung von Endothelzellen anzeigt und als molekularer Marker für den Nachweis dieser Aktivierung in Geweben eingesetzt werden kann (Lubeseder-Martellato et al. 2002, Guenzi et al. 2001). Die beschriebenen Ergebnisse führten des weiteren dazu, das das Protein GBP-1 ein in der Zelle wirkendes Protein ist, das im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist.

Die Induktion der GBP-1-Expression durch inflammatorische Zytokine geht in Endothelzellen mit einer Hemmung der Zellproliferation einher. Daher wurde untersucht, ob GBP-1 die durch inflammatorische Zytokine induzierte Proliferationshemmung vermittelt. Dazu wurden Endothelzellen mit retroviralen Vektoren transduziert, welche die konstitutive Expression von GBP-1 (GBP-1-Vektor) oder einer *antisense*-GBP-1-RNA (AS-Vektor) bewirken (Abb. 3A). Western blot-Analysen belegten, dass Endothelzellen die mit dem GBP-1-Vektor transduziert wurden, GBP-1 sehr stark exprimierten (Fig. 3B). In Zellen, die mit dem AS-Vektor transduziert wurden, war die Induktion der GBP-1-Expression durch IL-1 β effizient blockiert (Fig. 3B). Nachfolgende Proliferationsexperimente mit den verschiedenen transduzierten Zellkulturen zeigten, dass GBP-1 tatsächlich die durch angiogene Wachstumsfaktoren induzierte Zellproliferation hemmt (Fig. 3C, weiße Balken) und darüber hinaus notwendig ist, dass inflammatorische Zytokine die Proliferation von Endothelzellen hemmen können (Fig. 3D). Letzteres äußert sich darin, dass in *antisense*-GBP-1-RNA exprimierenden Zellkulturen die Hemmwirkung inflammatorischer Zytokine auf die Zellproliferation deutlich herabgesetzt ist (Fig. 3D, schwarze Balken) (siehe Guenzi et al. 2001).

Weiterführende Untersuchungen zur Struktur-/Funktionsbeziehung von GBP-1 zeigten, dass interessanterweise die Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen für Leukozyten, die ebenfalls durch inflammatorische Zytokine induziert wird, durch GBP-1 nicht beeinflusst wird (Guenzi et al. 2001). GBP-1 ist somit ein neuer, molekularer Marker für eine entzündliche Gefäßaktivierung, der selektiv die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen steuert.

Bislang konnte gezeigt werden, dass GBP-1 selektiv durch inflammatorische Zytokine induziert wird und dass dieser Prozeß mit einer anti-angiogenen Wirkung auf die betreffenden Zellen korreliert (Lubeseder-Martellato et al., 2002 und Guenzi et al., 2001). Während man sich Induktion von GBP-1 über dessen anti-proliferative Wirkung im Prinzip für medizinische Zwecke Rahmen einer anti-angiogenen Therapie zu Nutzemachen konnte, ist der Einsatz inflammatorischer Zytokine für derartige Zwecke aufgrund der pleiotropen und damit auch nachteiligen Effekte dieser Zytokine indiskutabel.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit Verfahren bereitzustellen, welches eine einfache und gezielte Analyse der Expression von GBP-1 ermöglicht. Diese Verfahren sollte Aussagen über das Stadiums und Fortschreiten einer Entzündungsreaktion in einem Individuum oder in einem in vitro Modell ermöglicht ohne dass eine aufwendige Analyse und Quantifizierung von vielen verschiedenen inflammatorischen Faktoren des sogenannten Zytokinnetzwerks notwendig ist.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Folglich betrifft die vorliegende Erfindung ein in vitro Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) In Kontakt bringen der Probe mit einem ersten Rezeptor, der GBP-1 oder ein Fragmente dieses Proteins spezifisch bindet; und
- (b) Nachweis einer spezifischen Bindung des Rezeptors mit GBP-1 oder einem Fragmente dieses Proteins.

5 Der Begriff Körperflüssigkeiten umfasst im Zusammenhang mit der Erfindung alle Arten von Körperflüssigkeiten. Beispiele sind Blut/Serum, Plasma, Fruchtwasser, Hirn-Rückenmarkflüssigkeit, Liquor, Zerebrospinalflüssigkeit, Sputum, Rachen und Schlund-Sekrete und andere Schleimhautsekrete, Synovialflüssigkeit, Ascites, Tränenflüssigkeit, Lymphflüssigkeit und Urin.

10 Der Begriff der „spezifische Bindung“ beschreibt erfindungsgemäß eine spezifische Interaktion oder Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor und einem Liganden. Ein Beispiel für einen solchen Liganden ist GBP-1 oder Fragmente dieses Proteins. Die spezifische Interaktion oder Wechselwirkung kann mit einem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ charakterisiert werden. Der Rezeptor und der Ligand besitzen Strukturen
15 oder Motive, die spezifisch zueinander passen, wie z.B. eine antigene Determinante (Epitop), die mit der Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers wechselwirkt. Entsprechend steht spezifische Interaktion im Gegensatz zu einer universelleren, unspezifischen Wechselwirkung.

Überraschenderweise wurde gezeigt, dass GBP-1 ein Markerprotein für
20 Entzündungsreaktionen ist, dass u.a. von endothelialen Zellen und Monozyten sezerniert wird. Durch diesen überraschenden Nachweis wird es möglich GBP-1 im Kulturüberstand von Gewebeproben, Proben von Körperflüssigkeit oder Proben von Zellkulturüberständen zu analysieren und eine Aussage über das Stadium einer entzündlichen Erkrankung zu treffen. Sezerniertes GBP-1 kann mit dem
25 erfindungsgemäßen Verfahren einfach und schnell nachgewiesen werden und dient somit als krankheitsassoziierter diagnostischer Parameter.

Der Nachweis einer entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen und Monozyten in der Körperflüssigkeit von Patienten mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist auf Grundlage der überraschenden Erkenntnisse von besonderer Bedeutung bei
30 Entzündungserkrankungen, AIDS, Allergien, Transplantationsreaktionen, Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen. Darüber hinaus sind diese von Bedeutung für

die Bestimmung der Ansprechreaktion bei Patienten unter der Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interferon- α); siehe Figur 5.

Der Nachweis, bzw. die quantifizierte Menge von GBP-1 in einer Probe einer Körperflüssigkeit eines Patienten ermöglicht Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad von Endothelzellen und Monozyten und damit eine Aussage über das Krankheitsbild des Patienten.

Verfahren zur Gewinnung von den genannten Proben sind dem Fachmann bekannt. Optional umfasst das erfindungsgemäße Verfahren darüber hinaus einen oder mehrere Waschschrte vor oder nach jedem Verfahrensschritt. Diese Waschschrte dienen der Minimierung von unspezifischen Reaktionen (falsch positiver oder falsch negativer Nachweis) und können die Sensitivität des Verfahrens verbessern.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst darüber hinaus den Schritt (a') oder (a'') vor dem in Kontakt bringen mit dem ersten Rezeptor:

- (a') Markieren der in der Probe enthaltenen Proteine; oder
- (a'') Markieren des ersten Rezeptors.

Die in der Probe enthaltenen Proteine und/oder der erste Rezeptor können beispielsweise chemisch markiert werden, z.B. durch die Kopplung von markierten chemischen Gruppen oder Markern an die freien Aminogruppen von in den Proteinen enthaltenen Cysteine. Beispiele für solche markierte chemische Gruppen sind Gruppen, die spezielle, nachweisbare Radioisotope enthalten. Als Marker können z.B. Fluoreszenzfarbstoffe dienen. Ein weiteres Beispiel für entsprechende Marker stellen Nukleinsäuren dar. Die Anwesenheit von auf diese Weise markierten Proteinen oder Rezeptoren in einer Probe kann dann mit geeigneten Primern in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.

Des weiteren ist es möglich Proteine physiologisch zu markieren, d.h. durch den metabolischen Einbau von markierten Molekülen. Zu diesem Zweck werden Zellen beispielsweise mit radioaktiv markierten Metaboliten inkubiert. Proteine, die während dieser Inkubationszeit aus der Biosynthese dieser Zellen hervorgehen und in welche die markierten Metaboliten eingebaut wurden, sind markiert. Dieses Verfahren ist z.B. geeignet um von antikörperproduzierenden Zellen sezernierte Antikörper zu markieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Rezeptor vor dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert.

- 5 Entsprechend einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Rezeptor nach dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert.

Rezeptoren können auf vielfältige Weise immobilisiert werden. Das entsprechende Verfahren hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. von der Art des
10 Rezeptors oder dem Material der Oberfläche. Eine Immobilisierung kann kovalent oder durch Adsorption erfolgen. Entsprechend einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Rezeptoren Proteine, weiter bevorzugt Antikörper. Ebenso bevorzugt ist auch die Verwendung von Peptiden oder organischen Molekülen als Rezeptoren.

- 15 Für die Immobilisierung von Rezeptoren, die Proteine sind, werden Verfahren beschrieben, bei welchen diese direkt auf einer Oberfläche mittels passiver Adsorption immobilisiert werden. Üblicherweise besteht eine entsprechende Oberfläche aus einem polymeren Kunststoff (z.B. Polystyrol, Polyvinyl, Latex) und z.B. in Form von Mikrotiterplatten oder Multi-well-Platten, Membranen oder
20 sphärischen 'Beads' (quervernetzten Polymeren in Partikelform) für diesen Zweck verwendet (Lowman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997), 401-24).

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Material der Oberfläche ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus
25 Sepharose, Latex, Glass, Polystyrol, Polyvinyl, Nitrocellulose und Silicium.

Weiter bevorzugt ist die Oberfläche in dem erfindungsgemäßen Verfahrens eine Membran, ein Kügelchen, ein Chip oder eine Platte.

Beispiele für Kügelchen sind Sepharose-beads oder Latex-beads, an die optional Liganden gebunden sind, die eine Immobilisierung der Rezeptoren an die
30 Oberfläche begünstigen. Solche Liganden sind beispielsweise Protein-A oder Protein-G, die eine Bindung von Antikörper an eine Oberfläche über den Fc-Teil der Antikörper begünstigen. Die Bindung des Rezeptors an Trägermaterial kann auch durch eine kovalente chemische Kopplungsreaktion (z.B. Hydrazid-Kopplung)

erreicht werden. Beispiel 3 beschreibt ein entsprechendes Verfahren. Ein anderes Beispiel für die Immobilisierung der Rezeptoren an die Oberfläche unter Verwendung von Liganden ist die Verwendung von Biotin und Avidin, bzw. Streptavidin.

- 5 Beispiele für Chips sind Siliziumplatten, auf die eine Vielzahl von verschiedenen oder gleichen Rezeptoren geordnet immobilisiert werden kann. Dies ermöglicht die Analyse einer Vielzahl von unterschiedlichen Parametern in einer Probe oder die Analyse einer Vielzahl von unterschiedlichen Proben auf einen oder mehrere Parameter hin, z.B. Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von
- 10 Fragmenten dieses Proteins in unterschiedlichen Gewebeproben, Proben von Körperflüssigkeit oder Proben von Zellkulturüberständen.

Beispiele für die genannten Platten sind Mikrotiterplatten oder Multi-well-Platten. Diese besitzen vorzugsweise 6, 12, 24, 48, 96, 128, 356, 1024 oder mehr wells. In Beispiel 4 ist ein Verfahren beschrieben, in dem 96well-Platten verwendet werden.

- 15 Entsprechend einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfasst dieses darüber hinaus den Schritt (a'') vor dem Schritt des Nachweises einer spezifischen Bindung:

- (a'') präzipitieren der Kügelchen mit den daran gebundenen Komplexen aus
- 20 erstem Rezeptor und GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins
- Kügelchen können aus einer Probe z.B. gravimetrisch präzipitiert werden. Dies kann beispielsweise durch Zentrifugation beschleunigt werden. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann u.a. aus Rehm, Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag, 2002 bekannt. Des
- 25 weiteren wird eine entsprechende Präzipitation in Beispiel 3 beschrieben.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst der Nachweis der spezifischen Bindung in Schritt (b) eine gelelektrophoretische Auftrennung, optional darüber hinaus eine Western-Blot-
- 30 Analyse (siehe Beispiel 3). Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann u.a. aus Rehm, loc. cit. bekannt.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zum Nachweis einer spezifischen Bindung von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins an den ersten Rezeptor in Schritt (a) die Probe mit einem zweiten Rezeptor für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins in Kontakt gebracht, der an ein Epitop von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins bindet, das nach Bindung des ersten Rezeptors an GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins zugänglich ist.

Diese bevorzugt Ausführungsform betrifft beispielsweise Verfahren, die sich das mechanistische Prinzip des Sandwich-ELISA's zu Nutze machen. Dieses Prinzip ist dem Fachmann allgemein bekannt und wird u.a. aus Stryer, Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, 1996 bekannt. Ein entsprechendes Verfahren ist darüber hinaus im beigefügten Beispiel 4 beschrieben.

Weiter ist der zweite Rezeptor für GBP-1 oder Fragmente dieses Proteins in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens markiert. Verfahren, die eine Markierung eines Rezeptors ermöglichen wurden oben beschrieben.

Darüber hinaus bevorzugt umfasst die Markierung des zweiten Rezeptors für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins ein signalgebendes System. Ebenso bevorzugt ist eine spezifische Erkennung der Markierung durch einen weiteren, dritten Rezeptor, der ein signalgebendes System umfasst.

Ein Beispiele für ein solches signalgebendes System ist die oben beschriebene Isotopenmarkierung, wobei das Signal die Abgabe von radioaktiver Strahlung ist. Ebenso resultiert eine Fluoreszenzmarkierung des entsprechenden Rezeptors in der Markierung mit einem signalgebenden System im Sinne der Erfindung, wobei das Signal die Emission eines Fluoreszenzsignals nach entsprechender Anregung des Farbstoffes ist.

Weiter bevorzugt umfasst das signalgebende System erfindungsgemäß ein Enzym, das ein Signal abgibt. Beispiele für solche Enzyme umfassen alkaline Phosphatasen, Peroxidasen, β -Galaktosidase, Glukoamylase, Urease, Chloramphenikol-Azetyltransferase. Entsprechende Beispiele und der Einsatz notwendiger Substrate für den Nachweis mit Hilfe von enzymatischen Reaktionen sind dem Fachmann bekannt, u.a. aus den Beipackzetteln kommerzielle erhältlichen

Nachweiskits oder aus Rehm, loc. cit. Solche kommerzielle erhältlichen Nachweiskits enthalten oft Antikörper, die Antikörper bestimmter Spezies erkennen, z.B. anti-Maus, und an die signalgebende Enzyme gekoppelt sind. Somit stellen entsprechende Antikörper ein Beispiel für einen dritten Rezeptor dar, die eine bestimmte Markierung des zweiten Rezeptors, nämlich dessen Fc-Teil erkennen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der erste und der zweite Rezeptor und, optional, auch der dritte Rezeptor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Polypeptiden, niedermolekularen Substanzen, Antikörpern oder Fragmenten oder Derivaten davon und Aptameren.

Der Begriff Peptide bezeichnet üblicherweise Aminosäureketten mit bis zu 30 Aminosäuren. Der Begriff Polypeptide bezeichnet Peptide, die üblicherweise mehr als Aminosäureketten 30 Aminosäuren umfassen und schließt Proteine ein.

Unter dem Begriff "niedermolekulare Substanzen" oder kleine Moleküle werden Moleküle verstanden, die von geringerer molekularer Komplexität sind, als die oben definierten Makromoleküle. In der Literatur wird der Begriff "niedermolekulare Substanzen" nicht einheitlich verwendet. In WO 89/03041 und WO 89/03042 werden Moleküle mit Molekülmassen bis 7000 g/mol als kleine Moleküle beschrieben. Üblicherweise werden jedoch Molekülmassen zwischen 50 und 3000 g/mol, häufiger aber zwischen 75 und 2000 g/mol und meistens im Bereich zwischen 100 und 1000 g/mol angegeben. Beispiele sind dem Fachmann aus den Schriften WO86/02736, WO97/31269, US-A-5928868, US-A-5242902, US-A-5468651, US-A-5547853, US-A-5616562, US-A-5641690, US-A-4956303 und US-A-5928643 bekannt.

Der Begriff „Antikörper“ umfasst erfindungsgemäß polyklonale Sera, wie auch monoklonale Antikörper.

Monoklonale Antikörper und Verfahren zu deren Herstellung sind dem Fachmann bekannt. Diese basieren auf einer zuerst von Köhler und Milstein (1975) beschriebenen Methode. Diese ist u.a. in dem Laborhandbuch von Harlow und Lane (Antibodies, A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory; (1988); Chapter 6) detailliert beschrieben. Durch die Definition umfaßt sind ebenfalls bispezifische Antikörper, synthetische Antikörper und Fragmente oder Derivate dieser Antikörper.

Diese umfassen Fragmente wie Fab, Fv oder scFv und chemisch modifizierte Derivate dieser Antikörper oder Antikörperfragmente.

Aptamere sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt.

- 5 Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Verfahren ein ELISA, EIA, oder RIA. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt aus Harlow und Lane, loc. cit. und Rehm, loc. cit.

- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise automatisiert ausgeführt. Dies ist u.a. möglich durch die Verwendung von Pipetierrobotern und für eine automatisierte Auswertung optimierter Arbeitsgänge.

Die Figuren zeigen:

15 **Fig. 1: Komplexität und Redundanz entzündlicher Endothelzellaktivierung.**

- (A) Die Aktivierung des Endothels bei entzündlichen Prozessen wird durch eine Vielzahl verschiedener löslicher Faktoren aus dem Blut und von benachbarten Zellen gesteuert. Dabei stehen im Rahmen der Neu- und Rückbildung von Gefäßen, sowie der Extravasation von Leukozyten die Steuerung von Zellproliferation, Apoptose, Invasion, Migration und Adhäsionsfähigkeit für Leukozyten im Vordergrund.

- 20 (B) Die Vielzahl der beteiligten Faktoren legt nahe, dass mehrere Faktoren ein- und dieselbe Aktivierung beeinflussen und zu wirkungsgleichen Gruppen zusammengefasst werden können. Gegenwärtig kann nicht bestimmt werden, wann und wo die verschiedenen Faktoren auf die einzelnen Endothelzellen einwirken. Darüber hinaus sind die Beziehungen der meisten Aktivierungsarten zueinander weitgehend unbekannt. Es ist zu bestimmen, ob alle Aktivierungen gleichzeitig in einer Zelle auftreten können (I) oder aufgrund zellbiologischer Restriktionen zeitlich, beziehungsweise räumlich separiert sein müssen (II).

Fig. 2: Expression von GBP-1 in kultivierten Endothelzellen und in entzündlichen Erkrankungen der Haut.

(A) Western Blot-Analyse der GBP-1 Expression in Endothelzellen, die mit den aufgeführten Faktoren für 24 h stimuliert worden waren. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: IFN- γ (100 U/ml), IL-1 α (5 ng/ml), IL-1 β (200 U/ml), TNF- α (300 U/ml), IL-4 (10 U/ml), IL-6 (50 U/ml), IL-10 (50 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), Oncostatin M (10 ng/ml), MCP-1 (50 ng/ml), PF4 (25 ng/ml), SDF-1 α (200 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), VEGF (10 ng/ml), Ang-2 (800 ng/ml) und PDGF B/B (100 ng/ml). Der gleichzeitige Nachweis des Zytoskelettproteins Aktin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

(B) Induktion der GBP-1-Expression in vaskulären Endothelzellen bei Hauterkrankungen mit einer inflammatorischen Komponente. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von GBP-1 (grün) und dem Endothelzell-assoziierten Antigen CD31 (rot) in Gewebeschnitten von gesunder Haut, Kaposi-Sarkom, entzündlicher Arzneimittelgegenreaktion der Haut und Psoriasis. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine Ko-Expression (gelb) von GBP-1 und CD31 (weiße Pfeile). (Modifiziert nach (Lubeseder-Martellato, Guenzi et al. 2002))

Fig. 3: GBP-1 vermittelt die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine in Endothelzellen.

(A) Schematische Darstellung des retroviralen Expressionsvektors pBabePuro (Kontrollvektor, K-Vektor) in den die cDNA von GBP-1 in beiden Orientierungen für die konstitutive Expression von GBP-1 (GBP-1-Vektor) und für die Expression einer GBP-1-*antisense*-RNA (AS-Vektor) eingesetzt wurde.

(B) GBP-1-Expression in K-, GBP-1-, und AS-Vektor transduzierten Endothelzellen, die entweder unbehandelt waren oder über einen Zeitraum von 24 h mit 20 U/ml IL-1 β stimuliert wurden. Der Nachweis der GBP-1-Expression erfolgte mittels Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-GBP-1-Antikörper. Die gleichzeitige Färbung mit Aktin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

(C) Proliferationsexperimente mit K-Vektor- und GBP-1-Vektor-transduzierten Endothelzellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen angiogener Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF in Kombination).

(D) Proliferationsexperimente von K-Vektor- und AS-Vektor-transduzierten Endothelzellen in Anwesenheit angiogener Wachstumsfaktoren und aufsteigender Konzentrationen von IL-1 β . (Modifiziert nach (Guenzi, Topolt et al. 2001))

5

Fig. 4: Nachweis von GBP-1 Protein in Kulturmedium von IFN- γ stimulierten HUVEC durch ELISA und Immunopräzipitation

[Bitte beachten Sie, dass wir die Abbildungen mit deutscher Beschriftung benötigen.]

10 HUVEC wurden Stimuliert mit 100 U/ml IFN- γ (IFN- γ) oder unbehandelt gelassen
(Medium). Nach 24 h Kultur wurde das Kulturmedium durch ELISA (A) oder
Immunopräzipitation (B) analysiert.

(A) Eine Verdünnungsserie mit rekombiantem aufgereinigtem GBP-1 wurde als
Standard verwendet (weiße Säulen). Die Menge von sekretiertem GBP-1 Protein
15 wurde im ELISA bestimmt (graue Säulen). Die Absorption wurde bei 405 nm
bestimmt.

(B) Westernblot-Analyse von immunopräzipitierten menschlichem GBP-1 Protein
mit monoklonalem anti GBP-1 Antikörper (Klon 1B1) aus dem selben
Kulturüberstand wie in (A).

20

Fig. 5: Messung von zirkulierendem GBP-1 im Plasma von IFN- α behandelten Patienten

Bei Melanom-Patienten, die für 9 bzw. 28 Tage mit IFN- α behandelt wurden, wurde
die Konzentration von zirkulierendem GBP-1 im Plasma mittels ELISA bestimmt.

25 Dargestellt ist der Anstieg der GBP-1 Konzentration von Tag 9 zum Tag 28 bei drei
Pateinten. ELISA-Mikrotiterplatten wurden mit einem monoklonalen Ratten anti-
GBP-1 Antikörper, Klon 1B1, für 16 h bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden die
Platten mit PBS-T (0,1 % Tween 20 in PBS) und für 30 min wurden bei
Raumtemperatur (RT) freie Bindungsstellen mit PBS-T/BSA 2 % (PBS-TB)
30 abgesättigt. Nach dem absaugen des PBS-TB erfolgte Inkubation (2 h) mit je 100 μ l
verschiedener Plasma Proben (1:2) bei RT. Als Standard wurde gereinigtes GBP-1-
His Protein, verdünnt in Zellkulturmedium (EMB-0,5% FCS) benutzt. Als
Negativkontrolle diente BSA. Die Proben wurden 4x mit PBS-T gewaschen, je 100

μ l polyklonaler Kaninchen anti-GBP-1 Antikörper (1:500) zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach viermaligen Waschen mit PBS-T erfolgte eine Inkubation (1 h, RT) mit je 100 μ l AP-konjugiertem anti-Kaninchen Antikörper (1:500 verdünnt in PBS-TB). Nach vier weiteren Waschschritten wurde der GBP-1 Protein/Antikörper-Komplex durch Inkubation mit 100 μ l p-Nitrophenyl Phosphat visualisiert. Die Absorption wurde bei 405 nm im Mikroplatten-Reader gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Standardkurve für die steigende Konzentrationen von gereinigtem GBP-1-His verwendet wurden. Die Linearität der Messung ist für einen Bereich von 0,1 bis 100 ng/ml gegeben.

Fig. 6: Die Sekretion von GBP-1 Protein aus IFN- γ behandelt HUVEC ist nicht zunehmende Zellmembranpermeabilität oder Apoptose zurückzuführen

Färbung von HUVEC mit dem nicht membrangängigen Farbstoff „Dead-Red“ (Molekular Probes).

HUVEC wurden über Nacht in 0,5 % FBS-haltigen EBM-Medium kultiviert und mit 100 U/ml Interferon- γ (IFN- γ , Roche) stimuliert. Kontrollzellen (Medium) wurden unbehandelt belassen. 24 h nach der Stimulierung wurden die Zellen mit *Dead-Red* Farbstoff angefärbt. Zellen, die eine veränderte Membranpermeabilität aufweisen (schwarze Balken), sind als Prozentsatz der Gesamtzahl (weiße Balken) angegeben.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung eines Vektorkonstruktes

Das 237 bp GBP-1 Promotorfragment (pro237-GBP-1) wurde mittels PCR-Amplifikation (PCR 2 Advantage Kit, Clontech) von dem Konstrukt pro3757-GBP-1 mit den Oligonukleotiden 5'-ATTTGAAGCTTCTGGTTGAG-3' [einfügen einer

HindIII-Schnittstelle (unterstrichen)] bzw. 5'-TGGCTTCTAGCACTTCTG-3' generiert. Das Konstrukt pro3757-GBP-1 enthält 3757 bp der 5'-regulatorischen Sequenz aufwärts des ATG-Kodons des *GBP-1* Gens (gi:4503938, NM_002053) im Vektor pT-Adv (Clontech). Das 237 bp Fragment wurde in Antisense-Orientierung mit dem Vektor pT-Adv ligiert, mit HindIII geschnitten und in den pGL3-Basic Vektor (Promega) subkloniert. Alle Konstrukte wurden mit dem Endofree Maxi Kit (Qiagen) aufgereinigt und zur Verifizierung sequenziert.

Beispiel 2: Etablierung einer geeigneten Zelllinie

HEK 293 T-Zellen (humane embryonische epitheliale Nierenzelllinie mit humanen Adenovirus Typ 5 (Ad 5) DNA transformiert (ATCC CRL 1573), welche zusätzlich mit SV40 T Antigen transformiert sind) wurden mit 3×10^5 Zellen/Well (6-Multi-Well Platte, Corning) 24 h vor der Transfektion ausgesät. Pro Well der 6-Well Platte wurden gesamt $0,8 \mu\text{g}$ Plasmid verwendet, wobei das Testplasmid pro237-GBP-1 im Verhältnis 1:5 mit dem Selektionsplasmid pBABE-Puro (P. Monini, Laboratory of Virology, Istituto Superiore di Santiá, Rome, Italien) eingesetzt wurde. Das Testplasmid pro237-GBP-1 enthält das 237 bp Promotorfragment gekoppelt an das Indikatorgen firefly-Luziferase, das Selektionsplasmid pBABE-Puro das Resistenzgen Puromycin, worauf anschließend selektioniert wird. Die Transfektion der Zellen wurde analog Vorschrift des Herstellers mit Effectene (Qiagen) durchgeführt und nach 24 h die Selektion mit $0,7 \mu\text{g/ml}$ Puromycin (Sigma) begonnen. Bei Tag 8-10 konnte das Wachstum von Einzelklonen beobachtet werden, die anschließend mit Klonierringen trypsiniert und in Einzelwells einer 96-well Platte (Falcon) überführt wurden. Bei entsprechender Konfluenz wurden die Klone weiter passagiert und auf ihre Reportergen-aktivität im Luziferaseassay untersucht. Die Klone wurden mit inflammatorischen Zytokinen IFN- γ , IL-1 β und TNF- α , sowie Buffer für 5 h stimuliert und in 1x „passive lysis buffer“ (Promega) abgeerntet. Die Lysate wurden auf firefly-Luziferase-Aktivität untersucht und entsprechend stabile Klone etabliert.

Beispiel 3: Immunopräzipitation von GBP-1

Frisch hergestellte Zelllysate wurden vorgereinigt durch Inkubation mit 2 μ l nicht mit GBP-1 reagierendem Präimmenserum von Kaninchen und 25 μ l Protein A/G Agarosebeads für mindestens 3 h bei 4°C auf einer Schüttelplattform. Nach dem Pelletieren der Beads wurde der Überstand mit 25 μ l Protein A/G Agarosebeads und 1 μ l von polyklonalem Kaninchenserum gegen GBP-1 über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplattform inkubiert. Die Beads wurden vier bis fünf mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 30 μ l Laemmli-Probenpuffer (2X) resuspendiert und für 5 min gekocht. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und in einem Westernblot oder in einer Autoradiographie analysiert.

Für die Immunopräzipitation von GBP-1 oder MMP-1 aus Zellkulturüberständen wurden 10 ml Kulturmedium auf Eis gestellt, 5 min zentrifugiert bei 1000 rpm, filtriert durch einen Filter mit einer Porengröße von 45 μ m und in einigen Fällen ein Proeinaseninhibitor-Cocktail (0,02 mg/ml Pankreasextrakt, 5 μ g/ml Pronase, 0,5 μ g/ml Thermolysin, 3 μ g/ml Chymotrypsin und 0,33 μ g/ml Papin) zugegeben. Die Vorreinigung wurde ausgeführt durch Inkubation mit 10 μ l Kaninchenserum und 120 μ l Protein A/G Agarosebeads für mehr als 3 h bei 4°C auf einer Schüttelplattform. Nach dem Pelletieren der Beads wurde der Überstand mit 120 μ l Protein A/G Agarosebeads und 6 μ l von polyklonalem Kaninchenserum gegen GBP-1 über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplattform inkubiert. Die Beads wurden vier bis fünf mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 60 μ l PBS + 60 μ l Laemmli-Probenpuffer (2X) resuspendiert und für 5 min gekocht. Üblicherweise wurden 15 μ l jeder Probe in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und in einem Westernblot analysiert.

Ein Beispiel für das Ergebnis eines Nachweises von GBP-1 durch Immunopräzipitation aus Kulturmedium ist in Figur 4B dargestellt.

Beispiel 4: GBP-1 ELISA

Für den entwickelten GBP-1 ELISA wurden folgende Puffer verwendet:

PBS enthaltend 0,1% Tween 20 (PBS-T) und PBS enthaltend 0,1% Tween 20 und 2% BSA (PBS-TB).

96-well-ELISA-Platen (Nunc-Immuno Plates) wurden beschichtet mit 100 μ l/well anti-GBP-1 Hybridomaüberstand (im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt) oder mit gereinigtem Rezeptor in der Konzentration von 1-5 μ g/ml (Inkubation für 16 h bei 4°C). Die Platten wurden mit PBS-T gewaschen und geblockt mit PBS-TB für mindestens 30 min bei Raumtemperatur. Die wells wurden abgesaugt und als Dubletten für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert mit 100 μ l des Standards (GBP-1-His, verdünnt in Zellkulturmedium enthaltend 5% FBS), der gleichen Konzentration von BSA als Kontrolle oder mit 100 μ l einer Probe in geeigneter Verdünnung (verdünnt in PBS). Die wells wurden vier mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 μ l eines polyklonalen Antikörpers gegen GBP-1, verdünnt in 1:500 in PBS-TB für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die wells vier mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 μ l einer alkalinen Phosphatase, die an einen anti-Kaninchen Antikörper konjugiert ist (Zymed, Berlin, Germany), verdünnt 1:500 in PBS-TB, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die wells vier mal mit PBS-T gewaschen und mit 100 μ l von p-Nitrophenyl Phosphat (Zymed) inkubiert. Die Absorption wurde bei 405 nm in einem „microplate reader“ (BioRad) bestimmt. Die Konzentration von GBP-1 in der Probe wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Das Verfahren zeigte eine Linearität von 0,1 bis 100 ng/ml von GBP-1/well. Die Variabilität der Ergebnisse in unterschiedlichen Assays lag zwischen 2,3 und 6%.

Ein Beispiel für das Ergebnis eines Nachweises von GBP-1 in Kulturüberstand durch ELISA ist in Figur 4A dargestellt.

Literatur

Carmeliet. and Jain: Nature 407(6801): 249-57 (2000).

Folkman: Nat Med 1(1): 27-31 (1995).

Guenzi, Töpol, Cornali, Lubeseder-Martellato, Jörg, Matzen, Zietz, Kremmer, Nappi, Schwemmle, Hohenadl, Barillari, Tschachler, Monini, Ensoli, and Stürzl: Embo J 20(20): 5568-77. (2001).

Harlow und Lane, "Antibodies, a laboratory manual", CSH Press 1988, Cold Spring Harbor

Töpol, Guenzi, Lubeseder-Martellato, Jörg, Naschberger, Stürzl: Proceedings of the 22nd Meeting of the European Society of Microcirculation (2002)..

- 5 Lubeseder-Martellato, Guenzi, Jörg, Töpol, Naschberger, Kremmer, Zietz, Tschachler, Hutzler, Schwemmle, Matzen, Grimm, Ensoli and Stürzl: Am J Pathol 161(5): 1749-59 (2002).

Prakash, Praefcke, Renault, Wittinghofer and Herrmann: Nature 403(6769): 567-71 (2000).

Ansprüche

1. In vitro Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines Zellkulturüberstandes, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
 - (c) In Kontakt bringen der Probe mit einem ersten Rezeptor, der GBP-1 oder ein Fragmente dieses Proteins spezifisch bindet; und
 - (d) Nachweis einer spezifischen Bindung des Rezeptors mit GBP-1 oder einem Fragment dieses Proteins.
2. Verfahren nach Anspruch 1, darüber hinaus umfassend den Schritt (a') oder (a'') vor dem in Kontakt mit dem ersten Rezeptor:
 - (a') Markieren der in der Probe enthaltenen Proteine; oder
 - (a'') Markieren des ersten Rezeptors.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rezeptor vor dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rezeptor nach dem in Kontakt bringen mit GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins auf einer Oberfläche immobilisiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei das Material der Oberfläche ausgewählt ist aus einer Gruppe bestehend aus Sepharose, Latex, Glass, Polystyrol, Polyvinyl, Nitrocellulose und Silicium.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die Oberfläche eine Membran, ein Kügelchen, ein Chip oder eine Platte ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, darüber hinaus umfassend den Schritt (a'') vor dem Schritt des Nachweises einer spezifischen Bindung:

(a'') präzipitieren der Kügelchen mit den daran gebundenen Komplexen aus erstem Rezeptor und GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Nachweis der spezifischen Bindung in Schritt (b) eine gelelektrophoretische Auftrennung, optional darüber hinaus eine Western-Blot-Analyse umfasst.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei zum Nachweis einer spezifischen Bindung von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins an den ersten Rezeptor in Schritt (a) die Probe mit einem zweiten Rezeptor für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins in Kontakt gebracht wird, der an ein Epitop von GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins bindet, das nach Bindung des ersten Rezeptors an GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins zugänglich ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der zweite Rezeptor für GBP-1 oder Fragmente dieses Proteins markiert ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Markierung des zweiten Rezeptors für GBP-1 oder eines Fragmentes dieses Proteins ein signalgebendes System umfasst oder durch einen weiteren, dritten Rezeptor, der ein signalgebendes System umfasst, spezifisch erkannt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das signalgebende System ein Enzym umfasst, das dieses Signal abgibt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei der erste und der zweite Rezeptor und, optional, auch der dritte Rezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Peptiden, Polypeptiden, niedermolekulare Substanzen, Antikörpern oder Fragmenten oder Derivaten davon und Aptameren.

5

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Verfahren ein ELISA, EIA, oder RIA ist.

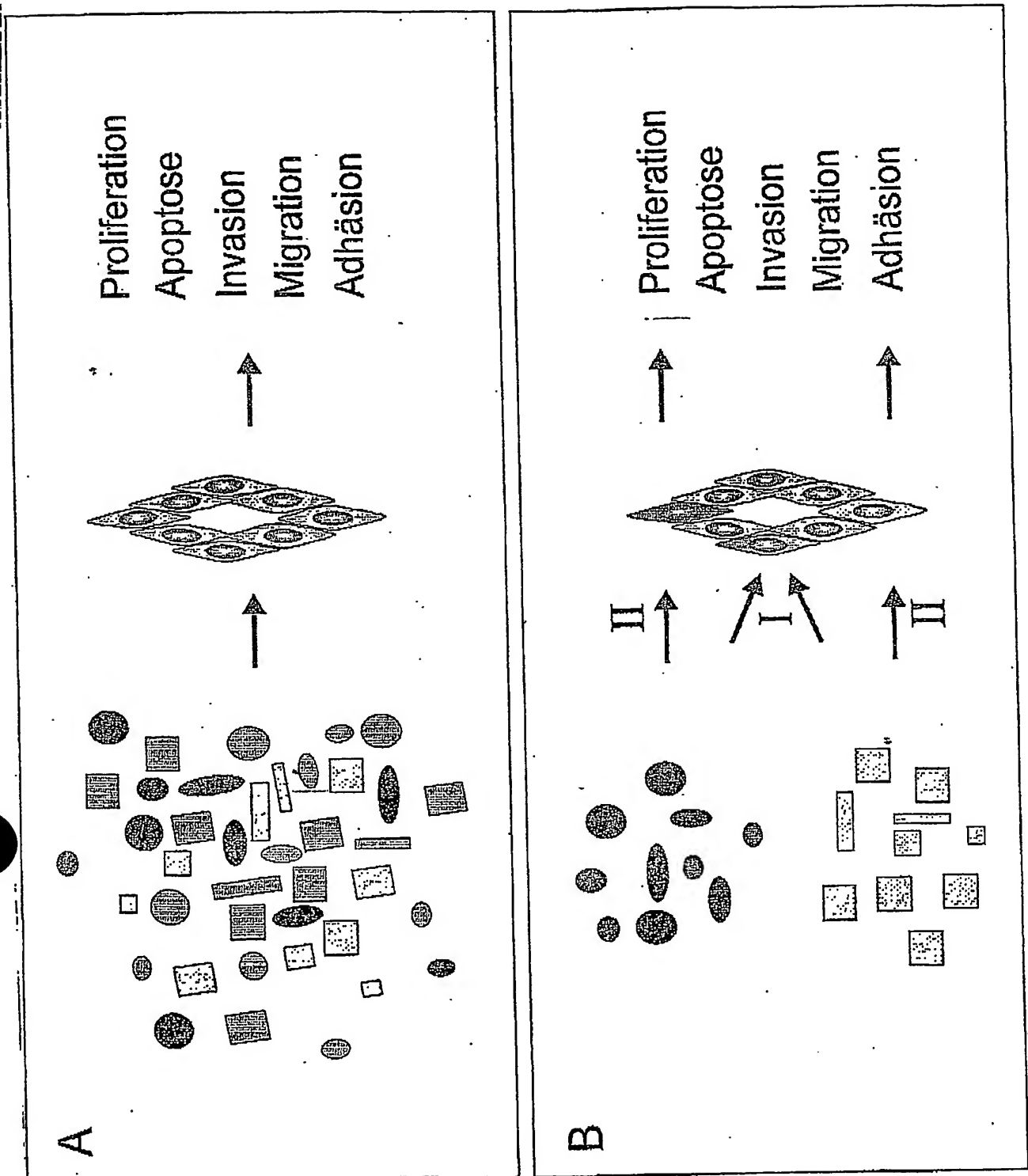
10

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Verfahren automatisiert ausgeführt wird.

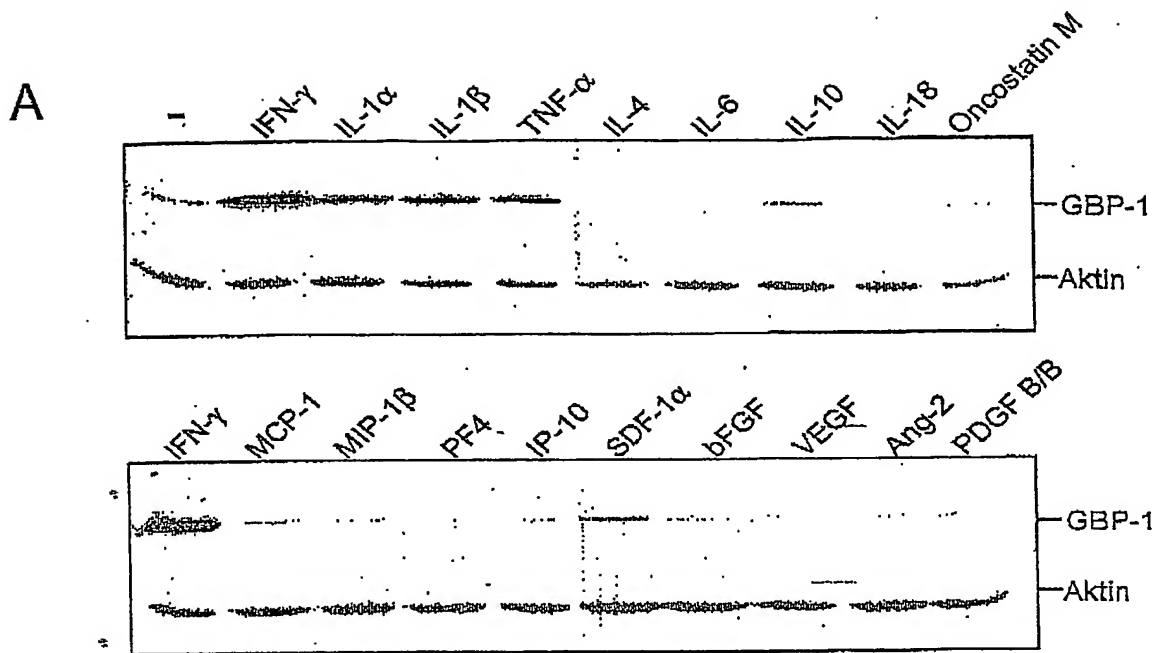
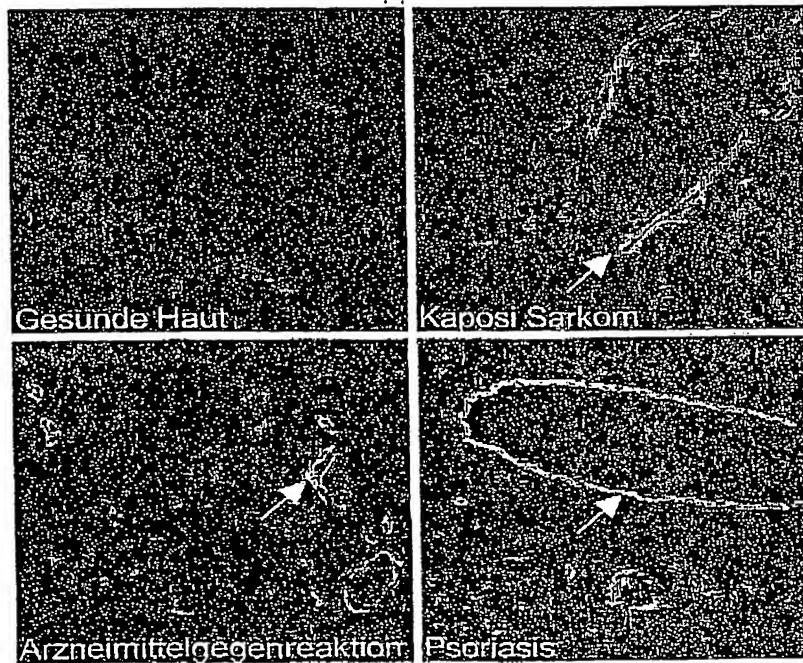
Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von GBP-1 oder von Fragmenten dieses Proteins im Kulturüberstand einer Gewebeprobe, einer Probe von Körperflüssigkeit oder einer Probe eines

5 Zellkulturüberstandes.

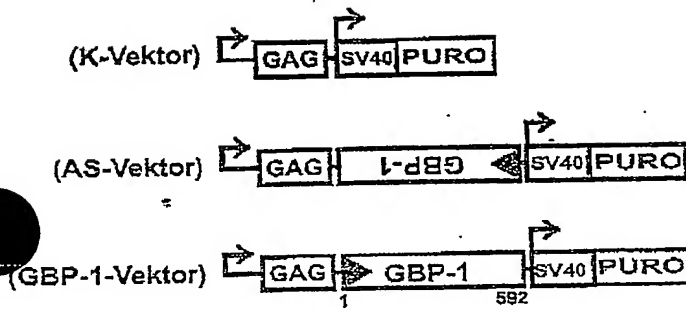


Figur 1

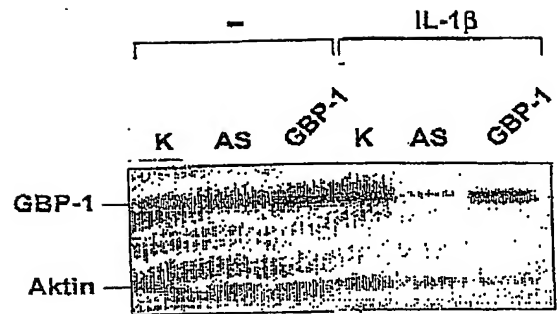
**B**

Figur 2

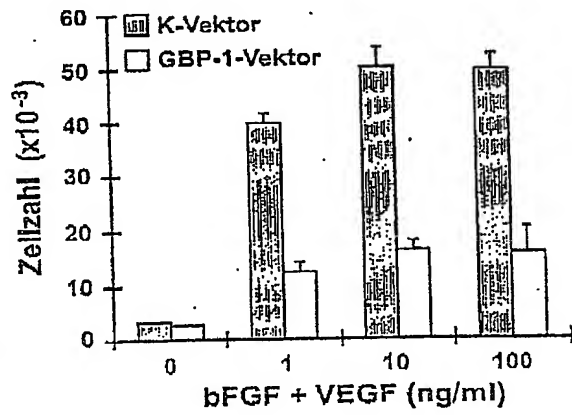
A



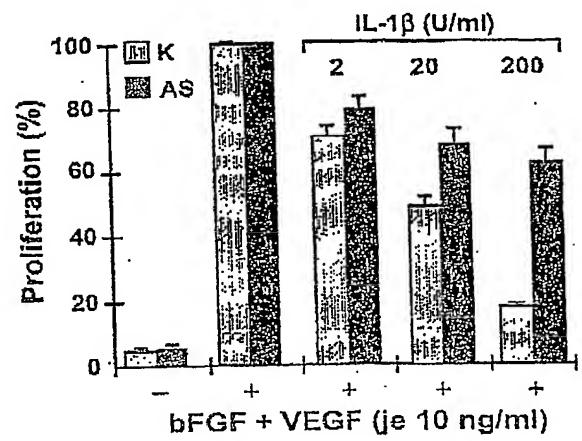
B



C

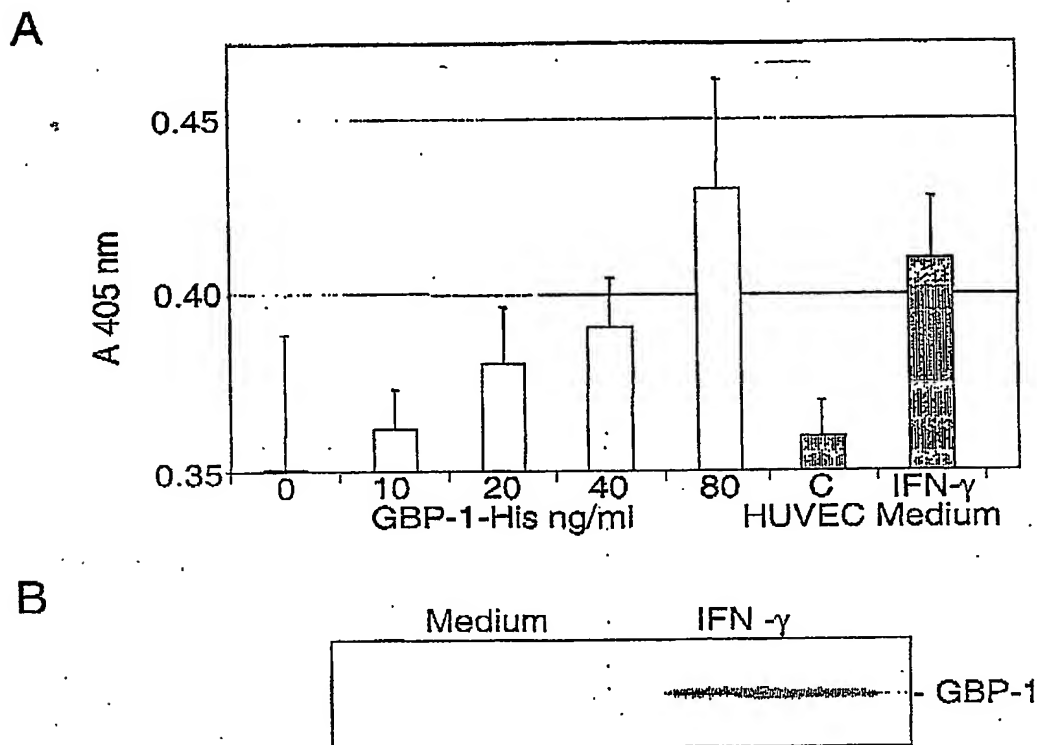


D



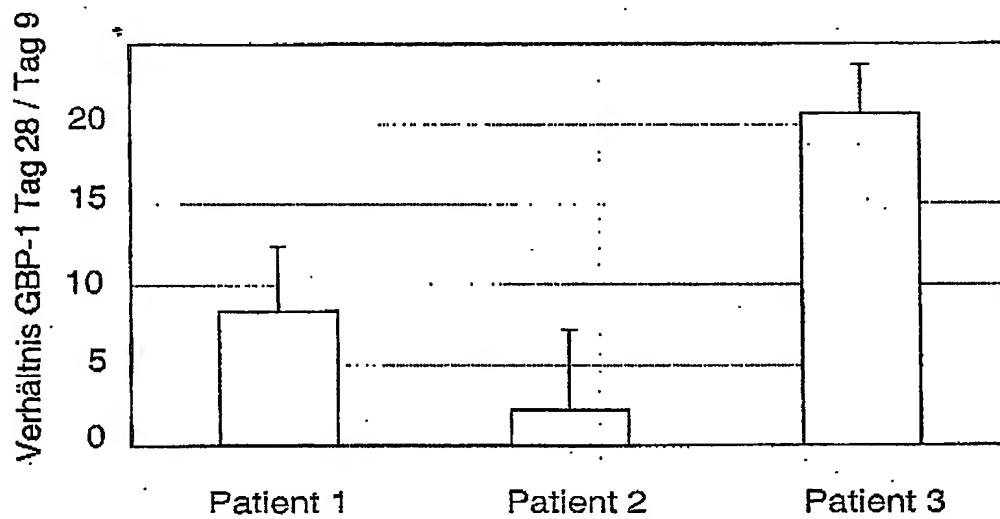
Figur 3

Nachweis von sezerniertem GBP-1 mittels ELISA



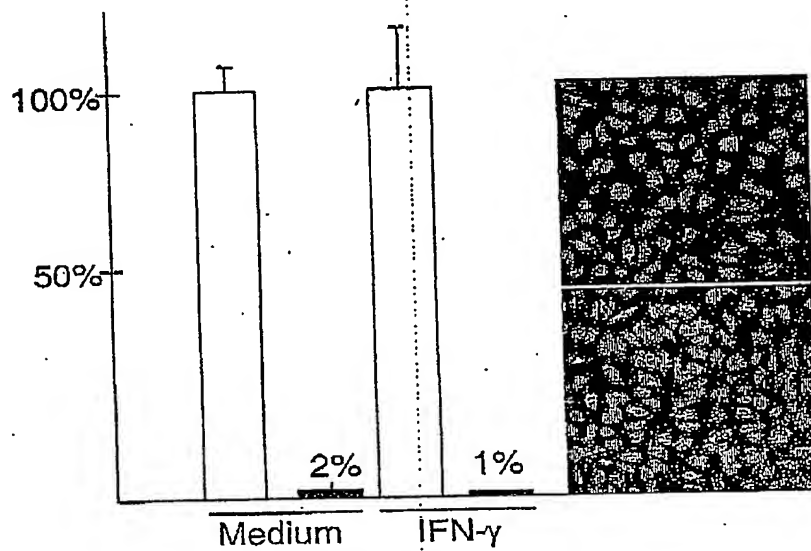
Figur 4

**Nachweis von zirkulierendem GBP-1 im Plasma IFN- α -
behandelter Patienten.**



Figur 5

**Sekretion von GBP-1 aus IFN- γ -behandelten HUVEC
beruht nicht auf einer Zunahme von Apoptose
und/oder Zellpermeabilität.**



Figur 6